

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：81303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15519

研究課題名(和文) PDXを用いた肺癌幹細胞を標的とした治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a specific therapy for lung cancer stem cells

研究代表者

阿部 二郎 (Abe, Jiro)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・がん幹細胞研究部・特任研究員

研究者番号：10573686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：私たちはPDXによって濃縮され、かつ大きく数を増加させたcancer stem cell (CSC)を用いて、相互関連の責任因子を標的としてCSCを撲滅させる治療法を開発することを本研究の目的とした。既存の細胞表面タンパクに対する抗体を用いてPDXを分画し、NOGマウスにおける造腫瘍能を指標に検討した。その結果、ある細胞表面受容体XXが肺扁平上皮癌の造腫瘍能に大きく関わることを見いだした。この表面タンパクをノックダウンすると、細胞増殖がほぼ停止した。また、アポトーシス細胞が増加し、細胞浸潤能が低下した。以上のことから、XXは肺扁平上皮癌の治療標的となると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the role of cancer stem cells in lung cancer, we developed patient-derived xenografts (PDXs) on NOG mice. We sorted the cells from lung squamous cell carcinoma PDXs by known cell surface markers and xenograft into NOG mice. We found that high expression of a molecule XX possess high tumorigenicity. By XX knock down using siRNA, the proliferation capacity was completely inhibited. Apoptotic cells were increased and migration capability was attenuated by XX knock down. These results suggested that XX may be a good therapeutic target for lung squamous cell carcinoma.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺癌

1. 研究開始当初の背景

肺癌は現在本邦の男女計で癌死の第1位の疾患であり、2015年の予測死亡数は8万人に迫っている。全体の5年生存率は44%とされているが、IA期が79%と良好であるのに対し、IIA期が47%、IIIA期が29%、IV期が6%と進行に伴い大きな差が生まれる。早期発見できれば良好な治療成績が期待できる反面、大部分は進行した状態で発見されその治療成績は芳しくないというのが現状である。従って、進行した肺癌に対する効果的な治療法を確立することが本邦における癌死を減らすための喫緊の課題である。

がん幹細胞(Cancer stem cell, CSC)は、高い腫瘍形成能を持ち抗がん剤や放射線療法に耐性を示し、再発や転移を引き起こす細胞である。従って、がんの根治にはこのCSCを撲滅する必要がある。しかし、がん組織におけるCSCの割合は非常に低く(1%以下)、研究に用いるのが困難なのが現状である。一方、ヒト癌検体を免疫不全マウス皮下に移植することによって形成される腫瘍は、patient-derived xenograft (PDX)と呼ばれ、継代を経ても起源となる腫瘍と同様の性格を示す。PDX腫瘍形成にはCSCの存在が必須であり、継代につれてCSCが濃縮されていくことが示唆されるとともに、マウスの数を増やすことで原発同様の組織を多数得ることが可能である。

癌細胞は酸素が充分にある状態でも、酸化的リン酸化ではなく解糖系によってエネルギーを得ることがWarburg効果として古くから知られている。Positron emission tomography (PET)はこの効果をがん診断に応用したものである。しかし、最近CSCは解糖系ではなく酸化的リン酸化によってエネルギーを得ている可能性が示唆され始めた。

癌細胞と癌細胞周囲の微小環境が相互的

に作用して癌の進展を促進することが癌間質相互作用として認識されている。つい最近膀胱癌組織において、癌細胞からのシグナルによって誘導されるオートファジーにより間質細胞が非必須アミノ酸であるアラニンを放出し、膀胱癌細胞がそのアラニンを酸化的リン酸化のエネルギー源として利用することで、細胞増殖を亢進させることが示された(Nature 2016)。つまり、間質細胞によって分泌される代謝物が癌細胞の代謝を変換させて癌進展に関与している。非CSCがCSCの特性を得るようになるとも考えられる。しかし、肺癌においても同様なことが言えるかは不明である。

通常は休眠状態であるCSCは周囲の微小環境のシグナルによって活性化されることから、CSCと間質細胞の相互関連を理解することはCSCを治療標的とする場合に非常に重要なポイントである。PDXでは、間質はマウスのものであるが、その腫瘍組織上でCSC-間質相互関連が構築されていることが推測され、in vivoモデルとなり得る。一方、ヒト手術検体から間質細胞株を樹立することは容易であり、PDX上で濃縮されたCSCを用いて、in vitroにおいてもCSC-間質関連の検証を行うことが可能である。

そこで、肺癌検体よりPDXを大量につくることによって大量のCSCを産生し、CSCと間質の関連を明らかにし、肺癌CSCを治療標的とした治療法を確立することが本研究の最終目的である。

2. 研究の目的

癌組織は多様な性質を持った不均一な細胞集団から構成されている。起源の癌組織を再構築できるごくわずかな細胞群の存在が示唆され、癌幹細胞(cancer stem cell, CSC)と呼ばれている。癌幹細胞の性質と

して：1)自己を複製する能力に加え他の細胞に分化する能力を持つ；2)細胞周期進行（細胞分裂速度）が遅い；3)細胞周期の静止期に存在している；4)腫瘍を形成する能力が高いことが挙げられている。癌幹細胞が分裂する際には自己と同じ性質を持つ細胞と、多様な癌細胞に分化する前駆細胞とに不均等に分裂する。前駆細胞は様々な性質の癌細胞に分化し、癌組織は癌幹細胞を中心としたヒエラルキーを形成していると想定されている。自己複製されたCSCは、微小環境（ニッチ）からの刺激を受けるまでは細胞周期の静止期に存在するため、増殖期にある細胞を標的とする抗癌剤や放射線に耐性を示すと考えられている。

また、CSCが1個でもあれば癌組織を再構成できることから、腫瘍の再発や転移の発生源と考えられており、癌幹細胞を消失させることなく癌組織を撲滅すること不可能である。

肺癌患者は増加の一途をたどっており、男女合わせ本邦の癌死因の第一位である。Stage IVの5年生存率は6%と低く、進行例に対する有効な治療法の開発が必要である。

他の固形癌ではCSCマーカーも確立され同定されやすくなってきているが、肺癌では未だマーカーが確立されておらず、肺CSCの研究が進んでいない。同定されたとしても、CSCのがん組織における割合は1%未満のことが多く、実験に用いるには困難である。

ヒト癌検体を免疫不全マウス皮下に移植することによって形成される腫瘍は、patient-derived xenograft (PDX)と呼ばれ、継代を経ても起源となる腫瘍と同様の性格を示す。PDX腫瘍形成にはCSCの存在が必須であり、継代を経るにつれて非CSCに比べCSCの割合が増え、CSCが濃縮さ

れていく可能性がある。また、わずかな肺癌組織から多数のPDX株を作製することが可能である。PDX作製によって、貴重な臨床肺癌検体の多数のコピーとCSCの濃縮ができるということになる。

癌細胞と周囲の間質細胞が相互的に作用し癌進展が促進されることが認識されてきている。癌細胞からの分子発現や分泌が間質細胞に作用し、間質で誘導された分子や代謝物が癌細胞の増殖や移動能を亢進させるといった報告が多くみられている。同様なことがCSCと間質にも起こっていることが想定される。

そこで、私たちはPDXによって濃縮され、かつ大きく数を増加させたCSCを用いて、CSCと周囲間質の相互関連を解析し、相互関連の責任因子を標的としてCSCを撲滅させる治療法を開発することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

肺癌手術検体の診療に不要な余剰検体を受け取り、ハサミで細切した上で、NOGマウス皮下に移植した。皮下腫瘍が長径1cm程度になったら、腫瘍を取り出し、細切した上で新たなNOGマウス皮下に移植した。

樹立したPDXを用いて、CSCマーカーの探索を行った。表面タンパクの発現強度によって細胞を分画し、免疫不全マウスにおける造腫瘍能を指標にCSCマーカーを同定した。

4. 研究成果

NOGマウスにおける肺癌のPDX樹立頻度は、肺腺癌は7.7%、肺扁平上皮癌は28.3%、肺腺扁平上皮癌は66.7%、大細胞癌は16.7%、小細胞癌は33.3%だった。

特に多くのPDXが樹立出来た肺扁平上皮癌を用いてCSCマーカーの探索を行った。既存の細胞表面タンパクに対する抗体を用いて

細胞を分画し、NOG マウスにおける造腫瘍能を指標に検討した。その結果、ある細胞表面受容体 XX が肺扁平上皮癌の造腫瘍能に大きく関わることを見いだした。この表面タンパクをノックダウンすると、細胞増殖がほぼ停止した。また、アポトーシス細胞が増加し、細胞浸潤能が低下した。

以上のことから、XX は肺扁平上皮癌の治療標的となると考えられた。現在、XX が細胞増殖能に関与する分子機構を探索中である。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

T. Okazaki, K. Tamai, R. Shibuya, M. Nakamura, M. Mochizuki, K. Yamaguchi, J. Abe, S. Takahashi, I. Sato, A. Kudo, Y. Okada, K. Satoh, Periostin is a negative prognostic factor and promotes cancer cell proliferation in non-small cell lung cancer, Oncotarget, 2018, in press

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

阿部二郎 (Abe, Jiro)
宮城県立がんセンター研究所・特任研究員

研究者番号：10573686

(2)研究分担者

佐藤賢一 (Satoh, Kennichi)

宮城県立がんセンター研究所・客員部長

研究者番号：10282055

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()